

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Februar 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/09374 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/02595**

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2000 (27.07.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 35 749.8 28. Juli 1999 (28.07.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EPIGENOMICS AG [DE/DE]**; Kastanienallee 24,
D-10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BERLIN, Kurt**
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, D-14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Joachimstrasse 9,
D-10119 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR CHARACTERIZING NUCLEIC ACID FRAGMENTS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN**

(57) Abstract: The invention relates to a method for characterizing a nucleic acid fragment, in which the following method steps are carried out: a) immobilizing the nucleic acid fragment that is to be characterized on a surface; b) producing an array of oligomers on a second surface, whereby the oligomers are provided with a marker; c) removing the synthesized oligomers from the surface without vacating a predetermined region on the surface; d) bringing the surface, on which the nucleic acids to be characterized are immobilized, into contact with the oligomer array surface, whereby complementary oligomers of the array hybridize on the DNA to be characterized; e) removing non-complementary oligomers, and; f) detecting the complementary oligomers using markers thereof, whereby sequence information is determined using the position on the surface.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Charakterisierung eines Nukleinsäurefragmentes, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt: a) man immobilisiert das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment auf einer Oberfläche; b) man stellt auf einer zweiten Oberfläche ein Array von Oligomeren her, wobei die Oligomeren mit einem Marker versehen sind; c) man löst die synthetisierten Oligomere von der Oberfläche ab, ohne dabei einen vorgegebenen Bereich auf der Oberfläche zu verlassen; d) man kontaktiert die Oberfläche, auf der die zu charakterisierende Nukleinsäure immobilisiert ist, mit der Oligomer Array Oberfläche, wobei komplementäre Oligomere des Arrays an die zu charakterisierende DNA hybridisieren; e) man entfernt nicht komplementäre Oligomere; f) man detektiert die komplementären Oligomere mittels deren Marker, wobei man anhand des Ortes auf der Oberfläche Sequenzinformation ermittelt.

WO 01/09374 A2

Verfahren zur Charakterisierung von Nukleinsäurefragmenten

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur
Charakterisierung von Nukleinsäurefragmenten.

10

Die WO-A-99/29897 offenbart ein Verfahren und ein Kit zur
Identifizierung von Nukleinsäuren. Hierbei werden
massenunterscheidbare Sonden verwendet.

15

US-A 5,929,208 beschreibt einen Hybridisierungsassay,
wobei die zu charakterisierende Nukleinsäure mit einer
Oligomer Array Oberfläche kontaktiert wird, wobei
komplementäre Oligomere des Arrays mit der zu
charakterisierenden DNA hybridisieren und nicht
hybridisierte Nukleinsäuren entfernt werden. Hierbei
werden bestimmte Positionen in einem Array mit Ladungen
versehen, so dass die Bindung von Oligomeren an bestimmte
Orte gesteuert wird.

20

25

Es sind heute verschiedene Verfahren bekannt, mit denen
man Oligonukleotid-Arrays herstellen kann. Sie lassen
sich grob in 3 Gruppen einteilen:

30

1) Alle Oligomere werden auf herkömmliche Weise einzeln
und in relativ großer Menge im Reagenzglas bzw. in den
speziellen Syntheseautomaten hergestellt und danach
einzeln auf den Träger aufpipettiert. Dazu verwendet man
üblicherweise automatische, hochpräzise
Mikropipettierroboter. Der Vorteil dieses Verfahrens ist,
dass es weitgehend auf bereits optimierten
Standardmethoden und -Geräten beruht. Dadurch kann man

qualitativ hochstehende DNA-Arrays mit sehr reinen Oligomeren herstellen, was einen äußerst positiven Einfluß auf die mit dem Array erzielbare Detektionsempfindlichkeit und -Zuverlässigkeit hat. Der große Nachteil des Verfahrens ist, dass es enorm aufwendig und deshalb teuer ist. Dies gilt in besonderem Masse für die Synthese der einzelnen Oligomere.

Der Kauf fertiger Oligomere stellt keine Lösung dar, da auch kommerziell synthetisierte Oligonukleotide in großen Zahlen extrem teuer sind, da die Synthese der Monomere relativ aufwendig ist, für einige spezielle Ausführungen Patentgebühren zu entrichten sind und außerdem die verwendeten Lösungsmittel aufgrund ihrer erforderlichen Reinheit teuer sind.

2) Die Oligomere werden durch pipettieren in kleinsten Mengen direkt auf dem Substrat synthetisiert. Auf jedem Rasterpunkt wird die dort vorgesehene Oligomerkette Nukleobase für Nukleobase aufgebaut. Zur Pipettierung verwendet man ähnlich wie bei Verfahren 1) einen spezialisierten Mikropipettierroboter oder z. B. eine Vorrichtung, die Kanäle zur Zuführung der einzelnen Synthesebausteine zu den jeweiligen Punkten des Arrays enthält (EP-A 0915897). Das chemische Syntheseverfahren ist grundsätzlich das gleiche wie bei der herkömmlichen Oligomer-Synthese im Syntheseautomaten. Der Unterschied ist, dass alle Oligomere unabhängig von deren Anzahl gleichzeitig, von einer einzigen automatischen Anlage direkt am vorgesehenen Bestimmungsort hergestellt werden. Die bei Methode 1) separaten Arbeitsschritte Oligomer-Synthese und Mikropipettierung sind nun zu einem einzigen Arbeitsschritt zusammengefaßt. Der Aufwand an Geräten und

an manueller Arbeit wird gegenüber Methode 1) erheblich reduziert.

3) Die Oligomere werden wie bei Methode 2) direkt auf dem
5 Substrat synthetisiert, die gezielte Anbindung der
richtigen Nukleobasen an den richtigen Rasterpunkten
geschieht jedoch durch eine vollkommen parallele, aus der
Halbleiterfertigung stammende photolithographische
Technik anstelle von sequentiellen, zielgenauen
10 Pipettierschritten. Das Verfahren basiert darauf, dass
man mit Licht einer bestimmten Wellenlänge gezielt die
5'-OH Schutzgruppen von Oligonukleotiden entfernen kann.
Durch geeignete örtliche Bestrahlungsmuster kann man
somit Oligonukleotid-Enden an genau jenen Rasterpunkten
15 reaktionsfähig machen, an die man im nächsten Schritt
einen neuen Nukleotidbaustein anbinden will. Bei
vollständiger Benetzung der Arrayoberfläche mit einer
Nukleotidbaustein-Lösung wird somit nur an den vorher
belichteten Stellen eine Nukleobase angebunden, alle
20 unbelichteten Stellen bleiben unverändert. Die örtlichen
Belichtungsmuster werden erzeugt, indem man eine
mikrophotographische schwarz-weiß Maske zwischen dem
Substrat und der Lichtquelle positioniert, die alle
Rasterstellen abdeckt, die nicht reaktionsfähig gemacht
25 werden sollen. Die Verlängerung der Oligomer-Ketten auf
allen Rasterpunkten um eine Nukleobase geschieht demnach
wie folgt: Mit Hilfe einer ersten Maske werden genau jene
Rasterpunkt belichtet, welche um die erste der 4
möglichen Sorten von Nukleobasen (z.B. C) erweitert
30 werden müssen. Danach wird der Array mit einer Lösung des
entsprechenden Nukleotidbausteins benetzt, worauf nur die
belichteten Punkte um diese Base verlängert werden. Da
die neu angebundenen Nukleotidbausteine noch alle über
eine Schutzgruppe verfügen, werden sie in den folgenden

Schritten nicht weiter reagieren, bis ihre Schutzgruppen durch eine weitere Belichtung abgespaltet werden. Nach diesem Reaktionsschritt wird das Array gewaschen. Nun werden mit Hilfe einer zweiten Maske genau jene

5 Rasterstellen belichtet, welche um die zweite der 4 möglichen Nukleobasen (z.B. T) erweitert werden müssen. Darauf wird das Array wiederum mit einer Lösung des entsprechenden Nukleotidbausteins benetzt und die belichteten Stellen dadurch um diese Base verlängert.

10 Genauso verfährt man für die verbleibenden zwei Nukleobasen (G und A). Für die Verlängerung aller Oligomere um eine Nukleobase benötigt man demzufolge vier Belichtungsschritte und somit 4 Photomasken.

15 Diese Methode ist wegen der hohen Parallelität in der Verarbeitung sehr schnell und effizient, zudem ist sie wegen der hohen Präzision, die mit Photolithographie erreicht werden kann, gut dazu geeignet, sehr hohe Rasterdichten zu erzielen.

20 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich auch einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der

25 dort zitierten Literatur entnehmen.

Patente, die sich allgemein auf die Verwendung von Oligomer Arrays und photolithographisches Maskendesign beziehen, sind z. B. US-A 5,837,832, US-A 5,856,174, WO-A

30 98/27430 und US-A 5,856,101. Zudem existieren einige Stoff- und Verfahrenspatente, welche die Verwendung photolabiler Schutzgruppen an Nukleosiden einschränken, so z. B. WO-A98/39348 und US-A 5,763,599.

Um DNA zu immobilisieren, existieren verschiedene Verfahren. Das bekannteste Verfahren ist die Festbindung einer DNA, welche mit Biotin funktionalisiert ist, an eine Streptavidin-beschichtete Oberfläche. Die Bindungsstärke dieses Systems entspricht einer kovalenten chemischen Bindung ohne eine zu sein. Um eine Ziel-DNA kovalent an eine chemisch vorbereitete Oberfläche binden zu können, bedarf es einer entsprechenden Funktionalität der Ziel-DNA. DNA selbst besitzt keine Funktionalisierung, die geeignet ist. Es gibt verschiedene Varianten in eine Ziel-DNA eine geeignete Funktionalisierung einzuführen: Zwei leicht zu handhabende Funktionalisierungen sind primäre, aliphatische Amine und Thiole. Solche Amine werden quantitativ mit N-Hydroxy-succinimidestern umgesetzt und Thiole reagieren unter geeigneten Bedingungen quantitativ mit Alkyljodiden. Eine Schwierigkeit besteht im Einführen einer solchen Funktionalisierung in eine DNA. Die einfachste Variante ist die Einführung durch einen Primer einer PCR. Gezeigte Varianten benützen 5'-modifizierte Primer (NH_2 und SH) und einen bifunktionalen Linker. Ein wesentlicher Bestandteil der Immobilisierung auf einer Oberfläche ist ihre Beschaffenheit. Bis jetzt beschriebene Systeme sind hauptsächlich aus Silizium oder Metall (magnetic beads). Eine weitere Methode zur Bindung einer Ziel-DNA basiert darauf, eine kurze Erkennungssequenz (z.B. 20 Basen) in der Ziel-DNA zur Hybridisierung an ein oberflächenimmobilisiertes Oligonukleotid zu verwenden. Es sind auch enzymatische Varianten zur Einführung von chemisch aktivierten Positionen in eine Ziel-DNA beschrieben worden. Hier wird an einer Ziel-DNA enzymatisch eine 5'- NH_2 -Funktionalisierung durchgeführt.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüberhinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, die die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Es sind mehrere Verfahren bekannt, die diese Probleme lösen. Meist wird eine chemische Reaktion oder enzymatische Behandlung der genomischen DNA durchgeführt, infolge derer sich die Cytosin von den Methylcytosin Basen unterscheiden lassen. Eine gängige Methode ist die Umsetzung von genomischer DNA mit Bisulfit, die nach alkalischer Hydrolyse in zwei Schritten zu einer Umwandlung der Cytosin Basen in Uracil führt (Shapiro, R., Cohen, B., Servis, R. Nature 227, 1047 (1970)). 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die Umwandlung von C in U führt zu einer Veränderung der Basensequenz, aus der sich durch Sequenzierung nun die ursprünglichen 5-Methylcytosine ermitteln lassen (nur diese liefern noch eine Bande in der C-Spur).

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, ist mitsamt der dazugehörigen Literatur dem folgenden Übersichtsartikel zu entnehmen: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations
Massenspektrometrie (MALDI) ist eine neue, sehr
leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von
5 Biomolekülen (Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. Laser
desorption ionization of proteins with molecular masses
exceeding 10.000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein
Analytmolekül wird in eine im UV absorbierende Matrix
eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix
10 ins Vakuum verdampft und das Analyt so unfragmentiert in
die Gasphase befördert. Eine angelegte Spannung
beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf
Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen
unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen
15 erreichen den Detektor früher als größere. Die Flugzeit
wird in die Masse der Ionen umgerechnet.
Technische Neuerungen der Hardware haben die Methode
signifikant verbessert. Erwähnenswert ist delayed
extraction (DE). Für DE wird die Beschleunigungsspannung
20 mit einer Verzögerung zum Laserpuls eingeschaltet und
dadurch eine verbesserte Auflösung der Signale erreicht,
weil die Zahl der Stöße verringert wird.

MALDI eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden
25 und Proteinen. Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit
etwa 100-mal schlechter als für Peptide und nimmt mit
zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Der Grund
dafür liegt darin, dass für die Ionisation von Peptiden
und Proteinen lediglich ein einziges Proton eingefangen
30 werden muß. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ
geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch
die Matrix wesentlich ineffizienter. Für MALDI spielt die
Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die
Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige

Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA sind zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices gefunden worden, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln.

Die Kopplung eines "charge tags" an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit in den gleichen Bereich wie er für Peptide gefunden wird. Durch diese Modifikationen hat sich auch die Möglichkeit eröffnet ähnliche Matrices, wie sie für die Desorption von Peptiden verwendet werden, zu benutzen. Ein weiterer Vorteil von charge tagging ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren. PNAs und Methylphosphonatoligonukleotide sind mit MALDI untersucht worden und lassen sich so analysieren.

Ein Array mit vielen tausend Ziel-DNAs kann auf einer Festphase immobilisiert und anschließend alle Ziel-DNAs gemeinsam auf das Vorhandensein einer Sequenz mittels einer Sonde (Nukleinsäure mit komplementärer Sequenz) untersucht werden.

Eine Übereinstimmung in der Ziel-DNA mit der Sonde kommt durch eine Hybridisation der zwei Teile miteinander zustande. Sonden können beliebige Nukleinsäuresequenzen von beliebiger Länge sein. Es existieren verschiedene

Verfahren für die Auswahl von optimalen Bibliotheken von Sondensequenzen, welche minimal miteinander überlappen.

- Sondensequenzen können auch gezielt zusammengestellt werden, um bestimmte Ziel-DNA Sequenzen aufzufinden. Oligofingerprinting ist ein Ansatz, bei welchem diese Technologie zum Einsatz kommt. Eine Bibliothek von Ziel-DNAs wird mit kurzen Nukleinsäuresonden abgetastet. Meist sind hier die Sonden nur 8-12 Basen lang. Es wird jeweils eine Sonde auf einmal an eine auf einer Nylonmembran immobilisierte Ziel-DNA-Bibliothek hybridisiert. Die Sonde ist radioaktiv markiert und die Hybridisierung wird anhand der Lokalisierung der Radioaktivität beurteilt.
- Die Nutzung von Oligomer Sondenbibliotheken zur Identifizierung immobilisierter Nukleinsäuren mittels Massenspektrometrie ist beschrieben worden (EP 97 12 1471.3 und EP 97 12 1470.5). In diesem Verfahren werden allerdings keine Oligomer Arrays verwendet.
- Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet sind für die Fluoreszenzmarkierung ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.
- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Charakterisierung eines Nukleinsäurefragmentes geschaffen, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- a) man immobilisiert das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment auf einer Oberfläche;
- b) man stellt auf einer zweiten Oberfläche einen Array von Oligomeren her, wobei die Oligomere mit einem Marker versehen sind;
- c) man löst die synthetisierten Oligomere von der Oberfläche ab, ohne dass diese dabei einen vorgegebenen Bereich auf der Oberfläche zu verlassen;
- d) man kontaktiert die Oberfläche, auf der die zu charakterisierende Nukleinsäure immobilisiert ist, mit der Oligomer Array Oberfläche wobei komplementäre Oligomere des Arrays an die zu charakterisierende DNA hybridisieren;
- e) man entfernt nicht komplementäre Oligomere;
- f) man detektiert die komplementären Oligomere mittels deren Marker, wobei man anhand des Ortes auf der Oberfläche Sequenzinformation ermittelt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment ein Amplifikat genomischer DNA ist.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, dass man die genomische DNA vor der Amplifikation mit einer Lösung eines Bisulfits, Disulfits oder Hydrogensulfits umsetzt.

Bevorzugt ist weiterhin, dass man das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment kovalent an die Oberfläche bindet. Bevorzugt ist es auch, dass man in das charakterisierende Nukleinsäurefragment eine Aminofunktion einführt und diese an eine durch Silanisierung derivatisierte Glasoberfläche bindet.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist das Verfahren ferner, wobei man die Oligomere des Arrays kovalent an die zweite Oberfläche bindet. Dabei ist es auch bevorzugt, dass man
5 in die Oligomere des Arrays eine Aminofunktion einführt und diese an eine durch Silanisierung derivatisierte Glasoberfläche bindet.

Es ist außerdem bevorzugt, dass man den Oligomer Array
10 durch Festphasensynthese der Oligomere auf der zweiten Oberfläche herstellt.

Besonders bevorzugt ist es, dass man die Festphasensynthese der Oligonukleotide auf der zweiten
15 Oberfläche in einer geschlossenen Synthesekammer durchführt, in welche man selektiv Synthesereagenzien einspeist. Hierbei ist insbesondere bevorzugt, dass man die Synthese der Oligomere durch selektive Zuführung der Synthesereagenzien an die jeweiligen Orte, an denen die
20 Oligomere synthetisiert werden, durchführt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, dass man photolithographische Methoden und photolabile Schutzgruppen zur Oligomersynthese verwendet.

25 Weiterhin ist auch bevorzugt, dass man für das photolithographische Verfahren elektronisch ansteuerbare und/oder veränderbare Masken verwendet. Hierbei ist besonders bevorzugt, dass man für die
30 photolithographische Verfahren ein selektiv schaltbaren Spiegelarray zur Erzeugung eines Belichtungsmusters verwendet.

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die
35 Synthese der Oligomere in einem Array von Kavitäten

durchführt, welche man gegebenenfalls weiterhin als Kammern für die Hybridisierung verwendet.

5 Eine bevorzugte Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ferner, dass man die Immobilisierung der zu charakterisierenden Nukleinsäurefragmente an einen Array von Kavitäten durchführt, welche man gegebenenfalls weiterhin als Kammern für die Hybridisierung verwendet.

10 Dabei ist es bevorzugt, dass man als Marker der Oligomere chemische Gruppen verwendet, welche eine Massenveränderung und/oder Fluoreszenz bewirken. Insbesondere bevorzugt ist es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, dass man die Detektion der hybridisierten
15 Oligomere mittels Massenspektrometrie, vorzugsweise mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI), durchführt.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, umfassend Reagenzien und/oder Referenz-Nukleinsäurefragmente und/oder Referenz-DNA und/oder behandelte Oberflächen und/oder
25 photolithographische Masken und/oder Oligomere.

Die vorliegende Erfindung also beschreibt ein Verfahren zur Charakterisierung von Nukleinsäuren. In einer besonders bevorzugten Variante dient es zur Identifizierung von Cytosin Methylierungsmustern in
30 Amplifikaten genomischer DNA.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Charakterisierung von Nukleinsäuren. Dazu wird die Nukleinsäure auf einer Oberfläche immobilisiert. Auf
35 einer zweiten Oberfläche wird ein Array von markierten Oligomeren, bevorzugt Oligonukleotiden, mittels

Festphasensynthese hergestellt und anschließend die Oligomere von der Oberfläche abgespalten, ohne dass diese einen vorgegebenen Bereich auf der zweiten Oberfläche verlassen können. Die beiden Oberflächen werden nach der
5 Zugabe einer geringen Menge einer Pufferlösung kontaktiert und die synthetisierten Oligomere hybridisieren an den Orten, an denen auch ihre Synthese stattfand, an die auf der ersten Oberfläche immobilisierte Nukleinsäure. An den Orten, an denen eine
10 Hybridisierung stattfand, können nachfolgend die Oligomere über ihre Marker registriert werden. Das Muster von hybridisierten Oligomeren, das dabei erhalten wird, wird für die Ermittlung von Sequenzinformation in der zu charakterisierenden Nukleinsäure verwendet. In einer
15 besonders bevorzugten Variante dient das Verfahren zur Identifizierung von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischer DNA. Dazu wird diese mit einer Bisulfitlösung behandelt und amplifiziert, bevor sie auf die erste Oberfläche aufgebracht wird.

20 Zur Charakterisierung einer amplifizierten genomischen DNA Probe werden Oligomer Arrays eingesetzt, indem die DNA Probe fluoreszenzmarkiert wird und an einen solchen Array von immobilisierten Oligomeren hybridisiert wird
25 (Stand der Technik). Ebenso ist es möglich, einen Array von Amplifikaten herzustellen und daran Sonden zu hybridisieren. Jedoch können dafür nur wenige Sonden gleichzeitig verwendet werden, da sie sich anhand z. B. ihrer Fluoreszenz nur eingeschränkt unterscheiden lassen.
30 Ein Patent, dass dieses Problem mittels Massenspektrometrie umgeht, ist im Stand der Technik erwähnt.

Diese Erfindung beschreibt die umgekehrte Variante, die
35 zu identifizierende DNA auf der Oberfläche zu immobilisieren, und dennoch die Vorteile der Oligomer

Array Technologie zu nutzen. Sie bietet zahlreiche Vorteile. Zum einen kann die Hybridisierung wesentlich schneller durchgeführt werden, da bei der hier beschriebenen Variante die kurzen Oligonukleotide über
5 eine extrem geringe Distanz zu der immobilisierten Ziel DNA diffundieren können und diese zudem in einem großen Überschuß vorliegen können. Zum anderen kann der Chip mit der kostbaren immobilisierten Ziel DNA so häufig wie für ihre vollständige Charakterisierung notwendig nach dem
10 Entfernen der Oligomere wiederverwendet werden. Es ist auch in vielen Fällen einfacher, Marker an die Oligomere anzubringen als an die oft in wesentlich geringeren Mengen vorliegende amplifizierte DNA. Dies gilt insbesondere, wenn die Detektion mittels
15 Massenspektrometrie erfolgt, da in diesem Fall die Oligomere direkt detektiert werden können. Diese Variante erlaubt auch die Verwendung von Oligomer Bibliotheken, deren Bestandteile alle über ihre Masse unterscheidbar sind.

20 Ein weiterer, wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass die Oligomere nicht mehr unbedingt in unmittelbarer Nähe der Oberfläche an die Ziel DNA hybridisieren, wie es sonst bei Arrays immobilisierter
25 Oligomere zwangsläufig der Fall ist. Dies verursacht häufig Probleme vor allem hinsichtlich der Hybridisierungseffizienz. Zugleich bleiben jedoch bei der vorliegenden Erfindung die allgemeinen Vorteile der Oligomer-Array Synthese, wie als Stand der Technik
30 beschrieben, erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Charakterisierung von Nukleinsäuren setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen:

1. Eine zu charakterisierende Nukleinsäure wird auf einer Oberfläche immobilisiert.
 2. Auf einer zweiten Oberfläche wird ein Array von Oligomeren hergestellt, die mit einem detektierbaren
5 Marker versehen sind.
 3. Die synthetisierten Oligomere werden von der Oberfläche abgelöst, ohne dabei einen vorgegebenen Bereich auf der Oberfläche zu verlassen.
 4. Die Oberfläche, auf der die zu charakterisierende
10 Nukleinsäure immobilisiert wurde, wird mit der Oligomer Array Oberfläche kontaktiert.
 5. Komplementäre Oligomere des Arrays hybridisieren an die zu charakterisierende DNA, und nicht komplementäre Oligomere werden durch
15 Waschschrirte entfernt.
 6. Die komplementären Oligomere werden über ihre Marker detektiert und anhand ihres Ortes auf der Oberfläche Sequenzinformation ermittelt.
- 20 Die zu charakterisierende Nukleinsäure kann genomische DNA, bevorzugt amplifizierte Fragmente einer genomischen DNA Probe oder auch RNA sein. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt zuvor eine Behandlung der genomischen DNA-Probe mit einer
- 25 Bisulfitlösung, um eine Umwandlung von Cytosin in Uracil zu bewirken, während Methylcytosin unter diesen Bedingungen nicht umgesetzt wird. Mit diesem vorangehenden Schritt ist es möglich, das Verfahren für die Identifizierung von Methylierungsmustern in
- 30 genomischer DNA zu verwenden. Die genomische DNA Probe wird bevorzugt, um die Sensitivität des Verfahrens zu verbessern, amplifiziert. Dies kann besonders bevorzugt mittels PCR erfolgen.

Im ersten Schritt des Verfahrens wird nun die zu charakterisierende DNA auf einer Oberfläche immobilisiert. Diese Oberfläche kann aus Glas, Quarzglas, oder auch beispielsweise Silicium bestehen. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Oberfläche chemisch aktiviert, so dass eine oder mehrere kovalente Bindungen der zu charakterisierenden Nukleinsäure zu der funktionalisierten Oberfläche geschaffen werden können. Diese Aktivierung der Oberfläche wird bevorzugt durch Silanisierung durchgeführt. Dabei kommt zum einen eine Aktivierung mit Epoxyfunktionen in Betracht, an die die zu charakterisierende DNA entweder direkt oder aber bevorzugt über eine in der PCR über einen Primer eingefügte primäre Aminofunktion bindet. Zum anderen kann die Oberfläche mittels Silanisierung aminofunktionalisiert werden. Die zu charakterisierende DNA kann dann über ein Linkermolekül mit dieser Aminofunktion verknüpft werden. Die zu charakterisierende DNA trägt in diesem Fall bevorzugt in der PCR angefügte Amino- oder Mercaptofunktionen. Als bifunktionale Linkermoleküle werden z. B. SIAB, DMS oder PITC verwendet.

Hinsichtlich der Vorbehandlung der Oberfläche und der Linkermethodik gilt gleiches für den zweiten Schritt des Verfahrens, der Herstellung der Oligomer Arrays auf der zweiten Oberfläche. Die Oligomer-Arrays werden effizient, wie es Stand der Technik ist, hergestellt, jedoch mit dem Unterschied, dass sie von der Festphase wieder abspaltbar sind. Diese Abspaltung kann entweder photochemisch oder durch die Einwirkung einer Säure oder Base, bevorzugt einer Base, erfolgen. Die Oberfläche kann für die Herstellung der Oligomer Arrays sowohl mit primären Alkohol oder Aminofunktionen derivatisiert werden. Die

primären Alkoholfunktionen werden dem Stand der Technik entsprechend mittels Epoxidierung der Oberfläche und nachfolgende Umsetzung mit einem Oligoethylenglykol, bevorzugt wird jedoch die kürzlich von Beier et al.

5 (Nucleic Acids Research, 1999, S. 1970-77) vorgestellte Aminofunktionalisierung von Glasoberflächen durchgeführt. Um eine photochemische Abspaltung durchführen zu können, muß nach der Amino- oder OH-funktionalisierung bevorzugt zunächst ein photospaltbarer Linker eingefügt werden. In
10 einer weiteren Ausführung des Verfahrens kommt für die Abspaltung der Oligomere nach der Synthese die von Beier und Pfeleiderer vergestellte Schutzgruppenstrategie zum Einsatz, wobei für die Abspaltung der Oligomere von der Oberfläche die Base DBU verwendet wird (DE-A 196 25 397).

15

Die Synthese der Oligomerarrays erfolgt in einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens in einer geschlossenen Synthesekammer, in welche die Synthesereagenzien selektiv eingespeist werden können.

20 Die Monomere werden jeweils direkt an die jeweiligen Syntheseorte geleitet, bevorzugt durch ein Pin-Tool oder über einen Piezo-Pipettierroboter, wobei die Synthesekammer für diesen Schritt geöffnet wird.

Alternativ kann die Synthese mittels

25 photolithographischer Methoden erfolgen, wie auch im Stand der Technik beschrieben. Dabei wird über eine Maske nur den Bereichen Licht zugeleitet, in den einer Kettenverlängerung des Oligomers um jeweils eine bestimmtes Monomer erfolgen soll (siehe Stand der
30 Technik). Besonders bevorzugt ist dabei die Verwendung dynamischer Masken, die durch elektronische Ansteuerung veränderbar sind. Diese Masken können entweder ein LCD Display, Mikroverschlußarrays oder ein schaltbares Glasfaserbündel sein. Zudem können über Arrays von

- kippbaren Mikrospiegeln, wie sie in modernen Projektoren verwendet werden, Punkten auf der Oberfläche selektiv Licht zugeführt werden. Alternativ können viskoelastische Mikrospiegel eingesetzt werden. Die photolithographischen Verfahren erfordern die Verwendung photolabiler Schutzgruppen an den Monomeren, während bei der Zuführung der Monomere mittels z. B. eines Pipettiersystems herkömmliche Schutzgruppen verwendet werden können.
- Es ist auch möglich, an einem oder mehreren Orten auf der zweiten Oberfläche mehrere unterschiedliche Oligomere oder Oligomer-Bibliotheken zu synthetisieren, sofern sie nach der Hybridisierung alle mittels der verwendeten Detektionsmethode unterscheidbar sind.
- Die Oligomer Arrays können aus Oligonukleotiden und/oder PNAs (Peptide Nucleic Acids) zusammengesetzt sein. Hinsichtlich der prinzipiellen Vorgehensweise bei der Synthese ändert dies wenig, es werden jeweils die dem Stand der Technik entsprechenden Syntheseverfahren angewandt. Werden jedoch Bibliotheken an einem oder mehreren Punkten des Arrays verwendet, so wird bevorzugt PNA eingesetzt, da hier leichter eine Massenunterscheidbarkeit der resultierenden Bestandteile der Bibliothek erzielt werden kann. Die Oligomere werden bei der Arraysynthese mit einer Markierung versehen, die bevorzugt entweder ein Fluoreszenzfarbstoff oder aber eine bestimmte Masse sein kann. Die Masse kann entweder die des Oligomers selbst oder aber die des Oligomers zuzüglich einer Massenmarkierung in Form einer funktionellen Gruppe sein.

Im dritten Punkt des Verfahrens wird nun eine Abspaltung der Oligomere von der Oberfläche durchgeführt. Dabei ist

zu beachten, dass die Abspaltung nicht zu einer lateralen Bewegung dieser Oligomere auf der Oberfläche führen darf, wobei die Ordnung des Arrays zerstört würde. Um dies zu verhindern, wird in einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens bereits die Synthese des Oligomer Arrays so durchgeführt, dass die Synthese eines jeden Typs von Oligomer in einer ihm zugeordneten Kavität stattfindet. Das Oligomer verläßt diese Kavität auch nach dessen z. B. photochemischer Abspaltung von der Oberfläche nicht.

10

Schließlich werden im vierten Punkt des Verfahrens die abgelösten, aber immer noch in der ursprünglichen zweidimensionalen Anordnung vorliegenden markierten Oligomere an die zu charakterisierende zu

15

charakterisierende Nukleinsäure hybridisiert. Dies erfolgt in einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens dadurch, dass in die Kavitäten der zweiten Oberfläche, in denen sich die Oligomere befinden, Hybridisierungspuffer gegeben wird und anschließend die erste Oberfläche mit der zu charakterisierenden Nukleinsäure mit der zweiten kontaktiert wird. Alternativ kann auch ausschließlich die erste Oberfläche oder beide Oberflächen Kavitäten enthalten, die dann jeweils mit Hybridisierungspuffer gefüllt werden. Dies kann beispielsweise bevorzugt mit einem Pipettierroboter oder einem Pin-Tool Roboter erfolgen. Das Raster der Kavitäten entspricht bevorzugt dem Raster von Oligomeren im Array auf der zweiten Oberfläche.

20

25

Nach der Hybridisierung der komplementären Oligomere an die zu charakterisierende Nukleinsäure werden die beiden Oberflächen voneinander getrennt und die nicht komplementären Oligomere von der ersten Oberfläche durch Waschschriffe entfernt.

30

Im sechsten Punkt des Verfahrens werden die komplementären Oligomere über ihre Markierungen detektiert. Aus der Arraysynthese ist bekannt, an welchem Punkt auf der ersten Oberfläche welche Oligomere hybridisiert haben können. Die Markierungen sind in einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens Fluoreszenzfarbstoffe, besonders bevorzugt wiederum Cy3 oder Cy5. In einem Fluoreszenz-Scanner kann nun die Fluoreszenz an jedem Ort auf der Oberfläche detektiert werden und mit der vorhandenen Ortsinformation die Identität der hybridisierten Oligomere bestimmt werden. Daraus wiederum wird vollständige oder partielle Sequenzinformation über die zu charakterisierende DNA erhalten.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens ergibt die Identität der hybridisierten Oligomere Information über Cytosin Methylierungen in der zu charakterisierenden DNA, falls diese vor Schritt 1 dieses Verfahrens mit einer Bisulfitlösung behandelt wurde.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Detektion der hybridisierten Oligomere mittels Massenspektrometrie, bevorzugt Matrix-assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-MS), durchgeführt. Dazu wird zunächst die erste Oberfläche mit den hybridisierten Oligomeren mit einer Matrix beschichtet und anschließend die jeweiligen Punkte im Massenspektrometer direkt angefahren. Die Software des Massenspektrometers erlaubt dabei die Zuordnung der erhaltenen Massenspektren zu den jeweiligen Punkten auf der Oberfläche. Die hybridisierten Oligomere werden über ihre Massen eindeutig identifiziert. In einer bevorzugten

Variante werden die Oligomere in der Arraysynthese mit Massenlabeln versehen. Dies sind Funktionalitäten, die nur eine Erhöhung der Masse des Oligomers um einen bestimmten Betrag zum Ziel haben, um dessen

5 Unterscheidbarkeit von Oligomeren anderer Sequenz zu sichern. So können auch an einem Punkt auf der zweiten Oberfläche von vorneherein mehrere unterschiedliche Oligomere oder auch Oligomerbibliotheken synthetisiert worden sein, wenn ihre Massenunterscheidbarkeit an

10 jeweils mindestens einem Punkt des Arrays gesichert ist. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens ergibt die Identität der hybridisierten Oligomere wiederum Information über Cytosin

15 Methylierungen in der zu charakterisierenden DNA, falls diese vor Schritt 1 dieses Verfahrens mit einer Bisulfitlösung behandelt wurde. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird diese Information in eine Datenbank eingegeben und mit dem zur charakterisierenden DNA gehörigen Phänotyp korreliert.

20 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1:

Synthese von DNA mit 5'-DMT und photolabilen Schutzgruppen

25 Die Synthese von DNA Oligomeren erfolgt nach dem etablierten Phosphoramidit-verfahren, hier auf modifizierten Glasoberflächen. Als 5'-Schutzgruppen können die säurelabile DMT-Gruppe oder photoabspaltbare

30 Gruppen verwendet werden, welche an sich bekannt sind. Zur Abspaltung dieser Gruppen werden im Falle des DMT's eine Lösung von Trichloressigsäure in Dichlormethan, im Falle der photolabilen Gruppen Licht mit geeigneter Wellenlänge, bevorzugt zwischen 320 und 365 nm,

35 verwendet. Die Abspaltung der Schutzgruppen auf den

exocyclischen Aminen und den Phosphaten erfolgt nach Standardverfahren mit konzentriertem Ammoniak.

Beispiel 2:

5 Synthese von PNA Oligomerarrays

Die Synthese von PNA Oligomeren (als Oligomerarray) wird durch Spotten der einzelnen Komponenten auf den Chip durchgeführt. Nach dem Spotten eines Monomers oder eines
10 Reagenzes wird der Chip mit Dimethylformamid gewaschen, um nicht umgesetzte Chemikalien zu entfernen. Dabei wird z. B. die PNA Sequenz 5'-AGC CAG CTC ACT ACC TAG-3' vom C-Terminus (3') hin zum N-Terminus (5') aufgebaut. Die Synthese erfolgt durch Binden der Säurefunktion des N-
15 geschützten Monomers G (Fmoc, 5 Äquivalente) in einer DMF-Lösung zusammen mit 5 Äquivalenten DIPEA, 7.5 Äquivalenten Lutidin und 4.5 Äquivalenten HATU auf die modifizierte Glasoberfläche. Die 5'-Amino-Gruppen der Monomere A, C, G und T sind mit einer Fmoc-Gruppe, die
20 exocyclischen Aminogruppen auf den Monomeren A, C und G sind mit einer Bhoc-Gruppe geschützt. PNA Monomere und Chemikalien sind kommerziell (z. B. Perkin Elmer) erhältlich.

25 Anschließend wird mit DMF gewaschen, nicht umgesetzte NH₂-Gruppen mit einem Gemisch aus Acetanhydrid/Lutidin in DMF gecappt, mit DMF gewaschen und die geschützte 5'-Aminofunktion mit 20 % Piperidin in DMF entschützt. Nach dem Waschen mit DMF wird das A-Monomer auf das gebundene
30 G-Monomer gespottet. Die vollständige PNA-Sequenz wird durch die nachfolgenden Syntheseyklen synthetisiert. Die Bhoc-Gruppen der exocyclischen Aminogruppen der Basen A, C und G werden am Ende der Synthese mit
35 Trifluoressigsäure unter Anwesenheit von m-Kresol entfernt.

Beispiel 3:

Synthese von DNA auf Chips, die einen photoabspaltbaren Linker tragen

5 Im ersten Schritt werden die Glassubstrate chemisch
modifiziert, so dass eine gezielte Anbindung von
Oligonukleotidbausteinen erfolgen kann, wie es Stand der
Technik ist. Durch Aufbringen von verschiedenartigen
10 Oligonukleotiden auf ein Substrat lassen sich
üblicherweise Oligonukleotid-Arrays herstellen. Dazu
werden die Substrate silanisiert, wobei das Silan eine
funktionalisierte (beispielsweise OH- oder NH₂-)
Alkylkette trägt. Anschließend wird die Oberfläche mit
einem photolabilen Linker versehen, beispielsweise 4[4-1-
15 (Fmoc-aminomethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxybutansäure
(Novabiochem). Dieser Linker erlaubt eine Abspaltung der
Oligonukleotide unter Einstrahlung von Licht der
Wellenlänge 365 nm. Die Synthese der Oligonukleotide,
beispielsweise der Sequenz 5'-AGC CAG CTC ACT ACC TAG-3',
20 erfolgt wie im Beispiel 1 für DMT beschrieben wurde auf
der entschützten Aminofunktion des Linkers. Schutzgruppen
der exocyclischen Amine, beispielsweise Benzoyl oder
Isobutyryl, werden mit konzentriertem Ammoniak entfernt.
Die Abspaltung der DNA vom gesamten Chip wird
25 photochemisch durchgeführt und anschließend von der
Oberfläche gewaschen.

Beispiel 4:

30 Synthese von PNA auf Chips, die einen photoabspaltbaren
Linker tragen

Die Modifizierung der Oberfläche des Glassubstrates
erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben mit einem
gespotteten photolabilen Linker. Die Synthese der PNA
35 Sequenz, beispielsweise 5'-AGC CAG CTC ACT ACC TAG-3',
wird durch Spotten der Komponenten wie in Beispiel 2

beschrieben auf der entschützten Aminofunktion des
photolabilen Linkers durchgeführt. Die Bhoc Schutzgruppen
werden mit Trifluoressigsäure entfernt und der
synthetisierte PNA Strang wird mit Licht der Wellenlänge
5 365 nm abgespalten.

Die Synthese von PNA auf photoabspaltbaren Linkern kann
auch großflächig auf dem gesamten Chip durchgeführt
werden, wobei die Komponenten über den Chip gespült
10 werden. Die Entschützung erfolgt wie beschrieben.

Beispiel 5:

Synthese von DNA auf Chips, die einen
nichtphotoabspaltbaren Linker tragen

15 Im ersten Schritt werden die Glassubstrate chemisch
modifiziert, so dass eine an sich bekannte gezielte
Anbindung von Oligonukleotidbausteinen erfolgen kann.
Dazu werden die Substrate silanisiert, wobei das Silan
20 eine funktionalisierte (beispielsweise OH- oder NH₂-)
Alkylkette trägt. Die Synthese des nichtphotoabspaltbaren
Linkers erfolgt durch Kopplung von 5'-geschützten T, A, C
oder G Monomeren mit Succinanhydrid und
Dimethylaminopyridin. Als Schutzgruppen auf den Monomeren
25 werden beispielsweise herkömmliche DMT- Gruppen für eine
großflächige DNA Synthese oder photolabile Gruppen in
Fall eines DNA-Arrays verwendet. Das zuvor behandelte
Monomer wird mit dem Substrat gekoppelt und die Synthese,
beispielsweise der Sequenz 5'-AGC CAG CTC ACT ACC TAG-
30 3', wird wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Die
Abspaltung der 5'-Schutzgruppen wird entweder mit
Trichloressigsäure
oder durch Einstrahlung von Licht (365 nm) vorgenommen.
Durch Einwirkung von Ammoniak Dampf wird die DNA vom
35 Substrat abgelöst und der Array durch Blotting auf eine
Nitrocellulosemembran übertragen.

Beispiel 6:

Blotting von DNA-Oligomer-Arrays

5 Um die aus Beispiel 5 von der modifizierten
Glasoberfläche abgespaltenen Oligomerarrays an die
Proben-DNA hybridisieren zu können, werden sie auf
Nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech, Hybond Serie,
Nitrocellulose
10 auf Nylon oder PVDF) geblottet, analog zur etablierten
Methode des "Southern Blots". Dabei wird die Anordnung
der Oligomere im Array nicht wesentlich verändert, sofern
der Abstand der Punkte im Array ausreichend ist. Dazu
wird der Glasträger mit der beladenen Seite auf einen
15 Nitrocelluloseträger gelegt, welcher vorher mit einem
Hybridisierungspuffer (SSC + SDS, Denhardt's Reagenz)
angefeuchtet wird. Durch Ausüben von Druck kommt es zur
Übertragung der Oligomere auf die Nitrocellulose. Auf der
Nitrocellulose ist bereits die Proben-DNA immobilisiert,
20 mit welcher dann die Oligomere spezifisch hybridisieren.
Nicht nicht hybridisierten Oligomere werden ausgewaschen.
Die Detektion erfolgt über einen an den Oligomeren
angebrachten Fluoreszenzmarker (siehe Beispiel 9).

25 Beispiel 7:

Synthese von PNA auf Chips, die einen
nichtphotoabspaltbaren Linker tragen

Die Substratoberfläche wird silanisiert, wobei das Silan
30 eine funktionalisierte (beispielsweise NH_2 - oder
Glycidoalkyl-) Alkylkette trägt. Anschließend erfolgt die
Kopplung des Amins mit einer Carbonsäure eines
nichtphotoabspaltbaren Linkers, beispielsweise eine
geschützte Hydroxyalkylcarbonsäure oder des Epoxides
35 unter sauren Bedingungen mit Ethylenglycolen
unterschiedlicher Kettenlänge. Die PNA Synthese

beispielsweise der Sequenz 5'-AGC CAG CTC ACT ACC TAG-3' wird wie im Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Die Kopplung des Monomers G mit dem endständigen Alkohol führt zur Ausbildung eines Esters. Die PNA Synthese kann
5 auch mit einer photoabspaltbaren Schutzgruppe auf den Amino-Gruppen durchgeführt werden. Dabei erfolgt die Abspaltung anstatt mit 20 % Piperidin in DMF mit Licht der Wellenlänge 365 nm. Durch Einwirkung von Ammoniak Dampf wird die PNA vom Substrat abgelöst und wird durch
10 Blotting auf Nitrocellulose mit der Proben-DNA kontaktiert.

Beispiel 8:

Blotting von PNA-Oligomer-Arrays

15 Das Verfahren zur Identifizierung von PNA Oligomeren ist ähnlich dem zur DNA-Identifizierung, es wird ein PNA-Hybridisierungspuffer verwendet. Dieses Verfahren ist analog zur etablierten Methode des "Western Blots" für
20 Proteine.

Beispiel 9:

Koppeln eines Fluoreszenz-Farbstoffs auf PNA Oligomere

25 Um einen fluoreszierenden Farbstoff, bevorzugt sind Cy3 oder Cy5, an PNA Oligomere zu koppeln, wird der N-Terminus (die 5'-Aminogruppe) mit dem N-Hydroxy-succinimid-Derivat des Farbstoffes unter Bildung eines Amids umgesetzt. Dazu wird das Farbstoffderivat in DMF
30 oder DMSO gelöst und in Gegenwart von Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffer mit den immobilisierten Oligomeren kontaktiert. Nach 2 h ist die Reaktion beendet und der überschüssige bzw. hydrolysierte Farbstoff wird durch
35 Waschschrirte mit Wasser und Methanol entfernt.

Beispiel 10:

Immobilisierung von PCR-Produkten auf modifizierten
Glasoberflächen

- 5 Um PCR-Produkte auf Glasträgern immobilisieren zu können,
werden sowohl die PCR-Produkte als auch Glasoberfläche
modifiziert. An das 3'-Ende der PCR-Produkte wird ein
Aminopropyl-Derivat gekoppelt, das eine freie Aminogruppe
liefert. Die Glasoberfläche wird mit 3'-Glycidoxi-
10 alkyltrimethoxysilan und katalytischen Mengen
Diisopropylethylamin derivatisiert und trägt ein Epoxid
auf der Oberfläche. Die Immobilisierung erfolgt durch
Spotten einer Lösung der PCR-Produkte in 0,1 M
Kaliumhydroxid und Inkubation für 6 Stunden bei 37 °C und
15 100% Luftfeuchte. Anschließend werden nicht gebundene
PCR-Produkte durch Waschen mit Wasser entfernt.

Beispiel 11:

- Immobilisierung der Proben-DNA auf Nitrocellulose oder
20 PVDF-Membranen

- Die Immobilisierung der Proben-DNA auf Nitrocellulose
oder PVDF-Membranen erfolgt nach den Angaben der
Hersteller. Besonders geeignet sind Membranen, die
25 bereits auf eine Glasoberfläche im Mikroskopträgerformat
(z. B. von Schleicher und Schüll) aufgebracht wurden und
sich daher nach der Hybridisierung in herkömmlichen
Fluoreszenzscannern einfach analysieren lassen. Nach der
Immobilisierung
30 werden die Membranen mit Hybridisierungspuffer
angefeuchtet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Charakterisierung eines
5 Nukleinsäurefragmentes, wobei man die folgenden
Verfahrensschritte ausführt:
 - a) man immobilisiert das zu charakterisierende
Nukleinsäurefragment auf einer Oberfläche;
10
 - b) man stellt auf einer zweiten Oberfläche einen
Array von Oligomeren her, wobei die Oligomere mit
einem Marker versehen sind;
 - 15 c) man löst die synthetisierten Oligomere von der
Oberfläche ab, ohne dass diese dabei einen
vorgegebenen Bereich auf der Oberfläche zu verlassen;
 - d) man kontaktiert die Oberfläche, auf der die zu
20 charakterisierende Nukleinsäure immobilisiert ist,
mit der Oligomer Array Oberfläche wobei komplementäre
Oligomere des Arrays an die zu charakterisierende DNA
hybridisieren;
 - 25 e) man entfernt nicht komplementäre Oligomere;
 - f) man detektiert die komplementären Oligomere
mittels deren Marker, wobei man anhand des Ortes auf
der Oberfläche Sequenzinformation ermittelt.
30
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment
ein Amplifikat genomischer DNA ist.
- 35 3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
dass man die genomische DNA vor der Amplifikation mit

einer Lösung eins Bisulfits, Disulfits oder Hydrogensulfits umgesetzt.

- 5 4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment kovalent an die Oberfläche bindet.
- 10 5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man in das charakterisierende Nukleinsäurefragment eine Aminofunktion einführt und diese an eine durch Silanisierung derivatisierte Glasoberfläche bindet.
- 15 6. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oligomere des Arrays kovalent an die zweite Oberfläche bindet.
- 20 7. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man in die Oligomere des Arrays eine Aminofunktion einführt und diese an eine durch Silanisierung derivatisierte Glasoberfläche bindet.
- 25 8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man den Oligomer Array durch Festphasensynthese der Oligomere auf der zweiten Oberfläche herstellt.
- 30 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Festphasensynthese der Oligonukleotide auf der zweiten Oberfläche in einer geschlossenen Synthesekammer durchführt, in welche man selektiv Synthesereagenzien einspeist.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
dass man die Synthese der Oligomere durch selektive
Zuführung der Synthesereagenzien an die jeweiligen
Orte, an denen die Oligomere synthetisiert werden,
durchführt.
- 5
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet, dass man photolithographische
Methoden und photolabile Schutzgruppen zur
Oligomersynthese verwendet.
- 10
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,
dass man für das photolithographische Verfahren
elektronisch ansteuerbare und/oder veränderbare
Masken verwendet.
- 15
13. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,
dass man für die photolithographische Verfahren ein
selektiv schaltbaren Spiegelarray zur Erzeugung eines
Belichtungsmusters verwendet.
- 20
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass man die Synthese der
Oligomere in einem Array von Kavitäten durchführt,
welche man gegebenenfalls weiterhin als Kammern für
die Hybridisierung verwendet.
- 25
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch
gekennzeichnet, dass man die Immobilisierung der zu
charakterisierenden Nukleinsäurefragmente an einen
Array von Kavitäten durchführt, welche man
gegebenenfalls weiterhin als Kammern für die
Hybridisierung verwendet.
- 30
16. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass man als Marker der
- 35

Oligomere chemische Gruppen verwendet, welche eine Massenveränderung und/oder Fluoreszenz bewirken.

- 5 17. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion der
hybridisierten Oligomere mittels Massenspektrometrie,
vorzugsweise mittels Matrix assistierter Laser
Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI),
durchführt.
- 10 18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass man Information über
Cytosin Methylierungen in einer genomischen DNA Probe
ermittelt.
- 15 19. Kit, zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der
voranstehenden Ansprüche, umfassend Reagenzien
und/oder Referenz-Nukleinsäurefragmente und/oder
Referenz-DNA und/oder behandelte Oberflächen und/oder
20 photolithographische Masken und/oder Oligomere.

Zusammenfassung

- Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur
- 5 Charakterisierung eines Nukleinsäurefragmentes, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:
- a) man immobilisiert das zu charakterisierende Nukleinsäurefragment auf einer Oberfläche;
 - b) man stellt auf einer zweiten Oberfläche ein Array von
 - 10 Oligomeren her, wobei die Oligomeren die mit einem Marker versehen sind;
 - c) man löst die synthetisierten Oligomere von der Oberfläche ab, ohne dabei einen vorgegebenen Bereich auf der Oberfläche zu verlassen;
 - 15 d) man kontaktiert die Oberfläche, auf der die zu charakterisierende Nukleinsäure immobilisiert sind, mit der Oligomer Array Oberfläche wobei komplementäre Oligomere des Arrays an die zu charakterisierende DNA hybridisieren;
 - 20 e) man entfernt nicht komplementäre Oligomere;
 - f) man detektiert die komplementären Oligomere mittels deren Marker, wobei man anhand des Ortes auf der Oberfläche Sequenzinformation ermittelt.